

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893142

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスを基盤とした生理活性物質のメカニズム解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the mechanism analysis method of bioactive compounds based on the chemical genetics

研究代表者

山野 喜 (YAMANO, YOSHI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号：70650597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物成分からの抗寄生虫活性物質の探索および、その作用メカニズムの解明を試みた。線虫 *C. elegans* を寄生虫のモデル生物として用いた抗寄生虫活性物質探索により、3種の植物から計14種の化合物を得た。さらに、*C. elegans* の遺伝子欠損株や薬剤耐性変異株を用いた作用メカニズム解析を行い、proctorione C の標的分子の推定に成功した。

研究成果の概要(英文)：we examined antiparasitic substance from plant extracts and tried to establish a new method for elucidating the action mechanism of active compounds. In this experiment, we used *C. elegans* as a model of parasite and isolated 14 compounds from 3 kinds of plants. Then the action mechanism of isolated compounds examined by using deletion mutant and drug-resistant mutant strain. The result showed that 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD-1) is candidate of target molecule of proctorione C.

研究分野：天然物化学

キーワード：線虫 *C. elegans* 抗寄生虫 生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規抗寄生性線虫薬の必要性

寄生性線虫による疾患は開発途上国を中心に蔓延しており、WHO の報告によると糸状虫やオンコセルカ症の感染者数だけで1億5千万人を超している。これら寄生性線虫は失明や象皮病などの深刻な後遺症を残すため、患者の QOL を大きく低下させる。さらに畜産動物や農作物にも線虫類は寄生しその生産力を大きく低下させることから、寄生性線虫対策は非常に重要な課題となっている。一方、その治療における薬剤への依存性の高さから、世界的に薬剤耐性寄生虫が拡大しており、新しい駆虫薬の開発は必要不可欠である。

(2) 生物活性物質の新たな作用メカニズム解析法確立の必要性

抗寄生性線虫薬の候補となりうる生物活性物質を発見しても、その作用メカニズムが明らかになっていなければ、実用化に向けた化学的改良などを行い創薬に結びつけることは難しい。そのため、これら生物活性物質の作用メカニズムの解明は化合物を有効活用する上で非常に重要な意味をもつ。しかし現在のところ、生物活性物質の作用メカニズムを解明する確立された方法は存在せず、多くの研究者がその解明に試行錯誤し、多大な時間とエネルギーを費やしている。このことから、生物活性物質の新たな作用メカニズム解析法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では植物資源からの抗寄生性線虫活性物質の探索を行なうと共に、生物活性物質の新たな作用メカニズム解析法の確立を目指した。抗寄生性線虫活性物質の探索源として植物資源を用いることにより、開発途上国において利用可能な新たな薬用植物を見出すことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) *C. elegans* を用いた抗寄生虫活性物質の探索

C. elegans は多細胞生物のモデルとして広く用いられている生物であるが、寄生性線虫と同じ線虫類に属している。このことから、*C. elegans* に対する生育阻害活性を生物活性物質探索の指標とすることで、寄生性線虫類に作用する生物活性物質の探索が行える。化合物の精製は、分配やカラムクロマトグラフィー、HPLC などを用いて行い、得られた化合物の構造は NMR や質量分析などから得られたデータを基に解析した。単離した化合物は、動物寄生性線虫や植物寄生性線虫に対する生育阻害活性も評価した。

(2) 標的分子の高発現に伴う耐性化を応用した生物活性物質の標的分子解析法の確立

多くの生物種において、生物活性物質の標的分子を高発現させると、その生物活性物質に耐性化が起きるといった現象が知られている。これまでに、この耐性化現象を応用した標的分子解析法ががん細胞や *mycobacterium* 属細菌を用いて行われてきており、本研究では、これらを *C. elegans* に応用することで *C. elegans* を用いた標的分子解析法を確立することを目指した。*C. elegans* の遺伝子高発現株ライブラリーを作成し、それら形質転換体を生物活性物質でスクリーニングし、得られた耐性株が高発現している遺伝子を明らかにすることで、標的分子を同定するという解析法の確立を試みた。

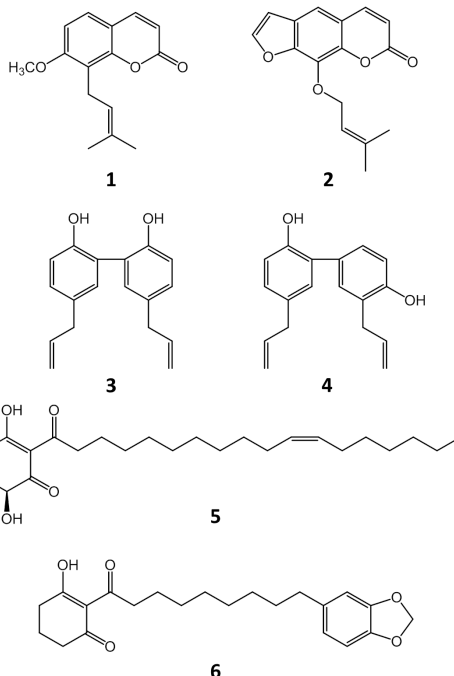
4. 研究成果

(1) 抗寄生虫活性物質の探索

C. elegans に対する生育阻害活性を指標とした抗寄生性線虫活性物質の探索

C. elegans に対する生育阻害活性を評価する活性試験法を構築し、それを用いて植物抽出エキス約600サンプルの中から生育阻害活性を示すエキスをスクリーニングした。その結果、50 ug/mL で100%の生育阻害活性を示すサンプルとして蛇床子 (*Cnidium monnieri*)、厚朴 (*Magnolia Bark*)、サダソウ (*Peperomia japonica*) の3種の抽出エキスを見出した。続いてこれらに含まれる生物活性物質の単離精製を行い、蛇床子からは Osthol (1)、imperatorin (2) などの既知化合物計7種を、厚朴からは Magnolol (3)、Honokiol (4) を単離、同定した。

さらにサダソウからは proctorione C (5) や新規化合物 compound A (6) を含む計5種を単離、同定、構造解析した。



動物寄生性線虫 *Heligmosomoides polygyrus* に対する生育阻害活性の評価

本研究で得られた化合物が、動物寄生性の線虫に対しても生育阻害活性を示すか検討した。

マウスから分離した *Heligmosomoides polygyrus* の卵、L1 幼虫、L3 幼虫を東京慈恵医大の嘉糠教授に分与して頂き、それらに対する proctirone C や compound A の作用を評価した。その結果、孵化阻害活性がそれぞれ IC_{50} 4.6 ± 2.4 、 6.8 ± 4.6 μ M、L1 幼虫に対する生育阻害活性がそれぞれ IC_{50} 3.2 ± 0.3 、 2.8 ± 0.3 μ M で見られた。一方、L3 幼虫には 100 μ M の高濃度条件下においても両方の化合物で致死活性が見られなかった。これにより *C. elegans* への生育阻害活性で単離した化合物が寄生性の線虫に対しても同様に生育阻害活性を示すことが確認された。

(2) 標的分子の高発現に伴う耐性化を応用した標的分子解析法の確立

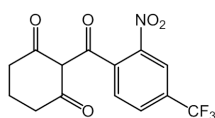
標的分子の高発現に伴う耐性化の確認

生物活性物質の標的分子が高発現することによる薬剤への耐性化が、*C. elegans* においても普遍的に見られるかを検討するため、コリンエステラーゼ阻害剤である trichlorfon を用いて、その標的分子高発現株への感受性の変化を確認した。

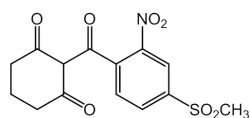
trichlorfon の標的遺伝子とされる *ace-1*、*ace-2*、*ace-3* を *C. elegans* ゲノム DNA をテンプレートに PCR で増幅後、マーカー遺伝子である *rol-6 (su1006)* と共にマイクロインジェクションにより *C. elegans* 生殖巣に導入することで、形質転換株を作成した。続いて、これらの形質転換株に対する trichlorfon の生育阻害活性を評価したところ、野生型との感受性の違いは確認できなかった。この結果から、研究開始当初に計画していた耐性現象を応用した標的分子同定法の確立は困難であると判断し、他の標的分子解析法を用いて標的分子の同定を行うこととした。

遺伝子欠損株を用いた標的遺伝子同定

サダソウより得られた proctirone C および compound A が有するトリケトン構造は、高チロシン血症型治療薬である Nitisinone (7) や除草剤として用いられている Mesotrione (8) などに見られる構造であり、トリケトン構造がその標的分子である 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) の活性サイトに結合し、その機能を阻害することが知られている。



7



8

C. elegans が持つ HPPD である HPD-1 のアミノ酸配列をヒトや植物のものと比較したところ、トリケトン構造の結合に關与するアミノ酸は *C. elegans* においても保存されていたことから、proctirone C と compound A は HPD-1 を標的としている可能性が高いと考えられた。そこで、*C. elegans* の *hpd-1* 欠損変異株である VC1539 を CGC から取り寄せ、その proctirone C と compound A に対する感受性を確認した。その結果、野性株では 100% 生育阻害を起こす 100 μ M の proctirone C 存在下でも、VC1539 に対してはほとんど生育阻害が見られなかった。一方で、compound A や trichlorfon では野性株と VC1539 株の間で感受性の変化は見られなかった。このことから、proctirone C の *C. elegans* 内での標的分子は HPD-1 であることが強く示唆された。一方、同じくトリケトン構造を有する compound A には HPD-1 以外の標的分子が存在することが示唆された。

耐性変異株を用いた標的遺伝子同定

compound A の標的分子を同定するため、変異誘発剤を用いて compound A の耐性変異株を作成し、その変異遺伝子を SNP マッピングで特定するという方法を試みた。

compound A が HPD-1 にも結合する可能性を考慮し、HPD-1 欠損変異株である VC1539 を用い、DNA 変異誘発剤である ethylmethanesulfonate で処理した後、F2 世代の L1 幼虫を compound A でスクリーニングすることで、耐性変異株の取得を試みた。その結果、1 mM の compound A 存在下でも生育が可能な耐性変異株の取得に成功した（野性株は 25 μ M で 100% 生育阻害）。現在、変異遺伝子の特定に向け検討中である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 太田涼介、杉本 幸子、手嶋 世里加、山野 喜、大塚 英昭、松浪 勝義 ツボクサ *Centella asiatica* の活性成分 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日 兵庫
2. 阪井史歩、杉本 幸子、山野 喜、大塚 英昭、松浪 勝義 ケナガエサカキ由来の新規ジテルペン配糖体 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 26 日 兵庫
3. Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka New Flavonoid Glycosides from *Linaria japonica*. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy 2014 年 9 月 13 日 福岡

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ネコブセンチュウ防除剤

発明者：永松ゆきこ、松浪勝義、山野喜
権利者：パネフリ工業株式会社、広島大学
種類：特許
番号：特許 2015-117968
出願年月日：2015 年 6 月 11 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/~shoyaku/
member.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/~shoyaku/member.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

山野 喜 (YAMANO YOSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：70650597

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし